



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 44 11 594 C 1

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/68

②① Aktenzeichen: P 44 11 594.6-41
②② Anmeldetag: 30. 3. 94
②③ Offenlegungstag: —
②④ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 14. 12. 95



DE 44 11 594 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

Deutsches RheumaForschungsZentrum, 14109
Berlin, DE

⑦④ Vertreter:

Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785
Berlin

⑦② Erfinder:

Weissensteiner, Thomas, Dipl.-Biochem., London,
GB

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 68 9 07 30 5T2
US 50 23 171

⑤④ Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen (HLA) in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik, die pharmazeutische Industrie und die molekularbiologische Forschung. Der erfindungsgemäße Testkit enthält Primer, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind, und einen Betain-enhaltenden Puffer.

DE 44 11 594 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitätsantigenen (HLA) in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation.

HLA-Allele spielen eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten, bei Immun- und Autoimmunreaktionen. Insbesondere HLA-B27 ist stark mit bestimmten Formen von Spondyloarthropathien assoziiert und kann helfen, diese frühzeitig von ähnlichen Krankheitsbildern zu unterscheiden.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik, die pharmazeutische Industrie und die molekular-biologische Forschung.

Genetische Tests in einem weiten Bereich von Forschung und klinischer Routine werden zunehmend auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Damit werden die Tests erheblich verbilligt und außerdem zuverlässiger gemacht. Die PCR ist 1987 entwickelt worden (Mullis, K. B. et al, *Methods in Enzymology* 155, 335—342, 1987), mit ihr können kleine Mengen von DNA durch Behandlung von einzelnen komplementären Strängen dieser DNA mit einem molekularen Überschuß von zwei Oligonukleotidprimern und deren Verlängerung zur Bildung einer DNA-Matrize schnell und sicher vermehrt werden (EP-A-200 362, EP-A-201 184, EP-A-258 017).

Auch in US 5,023,171 ist ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter DNA unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschrieben, wobei die rekombinante Doppelstrang-DNA mittels PCR in Gegenwart von oligo-a und oligo-d amplifiziert wird (SOE; gene splicing by overlap extension).

Mit Hilfe der PCR werden bereits HLA-Klassell Allele routinemäßig untersucht (Olerup et al, *Tissue Antigens* 39, 225—235, 1992).

Adrian V. S Hill et al (*The Lancet*, Vol. 337, March 16, 640—642, 1991) benutzten eine HLA-B spezifische PCR und Hybridisierung mit einem B*2703 spezifischen Oligonukleotid und fanden Hinweise, daß dieser für Westafrika (Gambia) charakteristische Subtyp als einziger wahrscheinlich nicht mit Bechterevs Syndrom assoziiert ist. HLA-B spezifische PCR und anschließende Hybridisierung mit Oligonukleotiden Spezifisch für die Subtypen B*2701 bis B*2706 wurde auch von O. Dominguez et al, *Immunogenetics* 36, 277—282, 1992) beschrieben.

Die Ähnlichkeit zwischen den HLA-Antigenen von Organspendern und -empfängern ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg von Organtransplantationen. Darüberhinaus sind einige Allele dieser Gene mit Resistenz oder Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten assoziiert.

B27 weist unter den HLA-Genen eine der stärksten positiven Assoziationen mit zwei überlappenden klinischen Krankheitsbildern auf, Akute Anteriore Uveitis (Baarsma, G. S., 1992, *Current Eye Research*, 11 suppl, 1—9) und Spondyloarthropathien (MacLean, L. 1992, *Ann. Rheum. Dis.* 51, 929—931).

Letztere sind ebenfalls, jedoch schwächer, mit den Antigenen B7, Bw22, B60 (Stein, M. et al, 1990, *J. Rheum.* 17, 1337—1339) und eventuell auch B44 (Thomson, G. T. D. et al, 1992, *Clin. Immunology*, 64, 227—232) und B62 assoziiert. Das B27-assoziierte Risiko für Bechterevs Syndrom erhöht sich ca. dreifach, wenn B60 (B*4001) auf dem anderen HLA-Haplotyp vorhanden ist (Robinson, W. P., 1989, *Arthritis and Rheumatism*, 31, 1135—1140).

Von den anderen B27-assoziierten Krankheitsbildern sind Subformen vorzugsweise mit anderen HLA-Antigenen assoziiert. B13, B16 und B17 (B57 und B58) können helfen, "rheumatische" Psoriatische Arthritis von "spondylitischer" (B27) zu unterscheiden (Salvarani, C. et al, 1989, *J. Exp. Rheum.* 7, 391—396; Torre-Alonso, J. C. et al, 1991, *Brit. J. Rheumatol.*, 30, 245—250). Eine ähnliche Differenzierung mit Hilfe von B62 ist wahrscheinlich beim Morbus Crohn möglich.

B60- und B15-DR4 Haplotypen könnten ebenfalls helfen, Subformen von rheumatischen Erkrankungen zu unterscheiden (Sanders, P. A. et al, 1988, *Tiss. Ant.* 33, 21—29; Charles, P. J. et al, 1991, *Disease Markers*, 9, 97—101; Brand, C. A. et al, 1992, *Ann. Rheum. Dis.* 51, 173—176). Der Haplotyp B44-C4A*3C4BQ*O—DR4 kommt vermehrt unter Patienten mit Felty's Syndrom in Rheumatoider Arthritis vor (Hammond, A. et al, 1992, *Clin. Exp. Imm.* 88, 163—168).

B60 sowie der Haplotyp B14-DR1 sind außerdem mit mildereren Formen von 21-Hydroxylasemangel in der nordeuropäischen Bevölkerung assoziiert (Speiser, P. W. et al, 1988, *N. Engl. J. Med.* 319, 19—23; Sinnott, P. J. et al, 1991, *Hum. Genet.* 87, 361—366; Azziz, R. et al, 1991, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 1327).

Obwohl in den letzten Jahren verschiedene Varianten der PCR-Reaktion entwickelt worden sind, kann ein sicheres Gelingen dieser Reaktion im allgemeinen nicht vorhergesagt werden. Von wesentlicher Bedeutung ist die Auswahl der zum Aufbau der Matrize geeigneten Primer. Aber selbst wenn die gewünschte Sequenz bekannt und der zur Hybridisierung geeignete Primer ausgewählt ist, ist eine erfolgreiche Amplifizierung noch nicht garantiert. Zahlreiche Beispiele zeigen, daß ein nach Kenntnis der gewünschten Sequenz ausgewählter Primer nicht zur erwarteten Amplifikation geführt hat.

Die Erfindung hat das Ziel, einen Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen auf der Basis der PCR-Reaktion zu entwickeln. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, dazu geeignete Primer aufzubauen und die Reaktionsbedingungen so zu gestalten, daß eine sichere Amplifikation gewährleistet ist.

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Wesentliches Merkmal sind die im Testkit verwendeten Primer, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der gesuchten Sequenz homolog sind, und der erfindungsgemäße Betain-Puffer. Es wurde gefunden, daß Basenmißpaarungen am 3'-Ende des Primers nach der Verlängerung durch Taq-Polymerase störend sind und dabei besonders das letzte Basenpaar entscheidend ist.

Mißpaarungen am vierten und den weiteren Basenpaaren vom 3'-Ende entfernt behindern die DNA-Polymerasereaktion praktisch nicht mehr.

Die erfindungsgemäßen Testkits enthalten die jeweils spezifischen Primer für einzelne HLA-Antigene gemäß den Ansprüchen 3—19.

Nachstehend wird eine Übersicht über die mit den erfindungsgemäßen Testkits bestimmbaren HLA-B-Allele und die im Testkit enthaltenen erfindungsgemäßen 3'- und 5'-Primer gegeben. Die erfindungsgemäßen Testkits können auch je einen der nachfolgend genannten 3'- und 5'-Primer in anderer als der beschriebenen Kombination enthalten. Daneben sind gleichzeitige Amplifikationen verschiedener Allele und Allelgruppen möglich, wenn mehrere der nachfolgend beschriebenen 3'- und 5'-Primer in derselben Reaktion verwendet werden ("Multiplex-PCR"). Entsprechend können die erfindungsgemäßen Testkits in einer besonderen Ausführungsform auch mehrere 3'- und 5'-Primer beinhalten. 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

1. Charakterisierung von Allelgruppen der B7-kreuzreaktiven Gruppe mit geringer Auflöesung

Primer	B7CREG3	B7CREG2b	B0740R	B0760R
Position	721 - 743	892-918	1446-1465	1490-1506

Produkte Groesse (bp)

B42 B7 B*40011 615

B73 B27 B*4001-4,6 745

1.1. Bestimmung von Allelen und Allelgruppen B7-kreuzreaktiven Gruppe : B*0701/2, B*0703, B42, B*40011, B*40012

Primer	B7CREG3	B7CREG1a	B7CREG2b	B7CREG2a	B0740R	B0760R
Position	721 - 743	836 - 852	892-918	904-926	1446-1465	1490-1506

Produkte Groesse (bp)

B41 B*4001 786
Reamplifikation von B*40011 und B*40012 zur Unterscheidung von B41 :
B*4001 745
Reamplifikation von B*40011 zur Unterscheidung von B41 und B*40012 :
B*40011 615

B*40011 B7 574

B42 B48 B7 B8 671

B73 B48 B7 B27 630

B*40011 B*0701-2 562

B7 : Amplifikation aller bekannten Subtypen B*0701-*0703
B27 : Amplifikation aller bekannten Subtypen B*2701-*2707
B48 : Amplifikation von B*4801, nicht B*4802
B*4001: Amplifikation von B*40011 und B*40012

Primer	B7CREG3	B7CREG1a	B7CREG2b	B7CREG2a	B0740R	B0760R
HLA-spezifisch fuer						
B7	N	JA	JA	JA	JA	JA
B8	N	JA	N	N	N	ja (mis3)
B*2701-6	JA	JA	N	N	JA	N
B*2707	JA	JA	N	N	JA	N
B41	JA	N	N	N	N	ja (mis3)
B42	N	JA	JA	JA	N	ja (mis3)
B*4801	N	JA	N	N	JA	JA
B*4802	?	JA	N	N	N	JA
B*40011 (B60)	?	N	JA	JA	JA	JA
B*40012 (B60)	JA	N	N	N	JA	JA
B40 (nicht-B60)	JA	N	N	N	JA(n.40.5)	N
B73	JA	JA	N	N	JA	N

... A. ... 007602 in Kombination mit einem vollständig komplementieren

j_n (mls3) : Nur geringfügig reduzierte Ausbeuten wenn B0760K in Kombination mit einem veresterten 5'-Primer verwendet wird

? : Keine Sequenzdaten fuer B*4802 und B*40011 Im Bereich von B7CREG3 verfuegbar

n.40.5 : Der Subtyp *4005 gehoert nicht der B7-kreuzreaktiven Gruppe an und wird mit B0740R nicht amplifiziert

1.2. Bestimmung HLA-B13, -B14, -B18, -B27, -B73 und von Allelen der serologischen Gruppen B12, Bw22 und Bw21

Primer	B7CREG3	B7CREG1a	B7CREG2a	B1344L	B27R	B2158R	B1322R	B4445R	D1418R
Position	721 - 743	836 - 852	904-926	938- 957	1250-1269	1274-1289	1306-1327	1459-1478	1470-1490

Produkte

Groesse (bp)

B*2701-*2706
B*2701-*2706
549
434
oder

B*2701-*2706, nicht B*2702

332

390

B13

B54 B55 B56

424

B45 B49 B50

569
oder

B45 B49 B50

607

B45

758

B44

531

D14 B73
B18 B73

654
769

Amplifikation aller bekannten Subtypen ausser im Falle von B27 (B*2707 : nicht amplifiziert)
Die Primerkombination B7CREG3/B1322R zeigt geringe, jedoch nicht stoerende Kreuzreaktivitaet mit HLA-75, B37 und B73

Primer	B7CREG3	B7CREG1a	B7CREG2	B1344L	B27R	B2158R	B1322R	B4445R	B1418R
HLA-spezifisch fuer									
B13	N	N	N	JA	N	N	JA	N	N
B14	N	JA	N	N	N	N	ja(mis2)	N	N
B38; B39 (B16)	N	JA	N	N	N	N	ja(mis2)	N	N
B18	JA	N	N	N	N	N	N	N	JA
B49; B50 (Bw21)	JA	N	N	N	N	JA	JA	N	N
B54 (Bw22)	N	N	JA	N	N	N	JA	N	N
B55; B56 (Bw22)	N	JA	JA	N	N	N	JA	N	N
B*2701, *2703-*2706	JA	JA	N	ja(mis3)	JA	N	N	N	N
B*2702	JA	JA	N	N	N	N	N	N	N
B*2707	JA	JA	N	ja(mis3)	N	N	N	N	N
B37	JA	N	N	ja(mis3)	N	N	ja(mis2)	N	N
B44 (B12)	N	N	N	JA	N	N	N	JA	N
B45 (B12)	JA	N	N	N	N	JA	JA	JA	N
B*4801	N	JA	N	N	N	N	N	N	N
B*4802	?	JA	N	N	N	JA	N	N	N
B73	JA	JA	N	N	N	N	ja(mis2)	N	JA
HLA-75	JA	N	N	N	N	N	ja(mis2)	N	N

2. Bestimmung von B13, B57 und Allelen der serologischen Gruppe B15

Primer		B15CREG	B57R	B62R	B1322R
Position		838 -855	1248-1269	1256-1261	1306-1327

Produkte

Groesse (bp)

B57

432

B*1501, B*1505, B*1507,
B*1517

424

B13

490

B57 : Amplifikation aller bekannten Subtypen

Primer		B15CREG	B57R	B62R	B1322R
HLA-spezifisch fuer					
B13		JA	N	N	JA
B*1501 (B62)		JA	N	JA	N
B*1505, B*1507, B*1517		JA	N	JA	N
B57 (B17)		JA	JA	N	N

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

HLA-B Primersequenzen

Referenz
(Genbank Release 81.0 (2/94))
X03945

Primer	Sequenz	Position
B7CREG1a	5' GCC GCG AGT CCG AGA GA 3'	836 - 852
B7CREG1b	5' CGC CGC GAG TCC GAG AG 3'	835 - 851
B7CREG2a	5' GAA CAC ACA GAT CTA CAA GGC CC 3'	904 - 926
B7CREG2b	5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3'	892 - 918
B7CREG3	5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3'	721 - 743
B4445R	5' CAC CAG GTA TCT GCG GAG CG 3'	1459 - 1468
B1418R	5' CTC CTT CCC GTA CTC CAG GTG 3'	1470 - 1490
B2158R	5' GAG GAG GCG CCC GTC G 3'	1274 - 1289
B1322R	5' TGT AAT CCT TTC CGT CGT AGG CTA 3'	1306 - 1327
B27R	5' CCA CGT CGC AGC CAT ACA TA 3'	1250 - 1269
B1344L	5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3'	938 - 957
B0760R	5' CC GCG CGC TCC AGC TTG 3'	1490 - 1506
B0740R	5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3'	1446 - 1465
B15CREG1	5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3'	838 - 855
B62R	5' CCC CAC GTC GCA GCC G 3'	1256 - 1271
B57R	5' CCA CGT CGC ATC CAT ACA TCA C 3'	1248 - 1269

<u>Primer fuer interne Kontrollen</u>				
Primer	Sequenz	Position	Referenz (Genbank Release 81.0 (2/94))	
xabl	5' AAC TGC AGA GCG ACT TCC ATT C 3'	9587 - 9608	X71937	
xabr	5' AGG TCA TGC AGG GGG TAG TCC A 3'	10579 - 10600		
tnfbl	5' CGT GCT TCG TGC TTT GGA CTA 3'	870 - 890	M16441	
tnfbr	5' AGC TGG TGG GGA CAT GTC TG 3'	1588 - 1607		

Als Primer für die internen Kontrollen sind in den erfindungsgemäßen Testkits enthalten:

xabl 5' AAC TGC AGA GCG ACT TCC ATT C 3'
Position 9587 - 9608

xabr 5' AGG TCA TGC AGG GGG TAG TCC A 3'
Position 10579 - 10600

tnfbl 5' CGT GCT TCG TGC TTT GGA CTA 3'
Position 870 - 890

tnfbr 5' AGC TGG TGG GGA CAT GTC TG 3'
Position 1588 - 1607

Die erfindungsgemäßen Testkits können die in der PCR bekannten und üblichen Puffer enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten sie jedoch einen Betain (N,N,N-Trimethylglycin)-Puffer für die PCR-Amplifikation.

Der Puffer kann 200–1000 mM Betain enthalten. Er besteht in einer bevorzugten Variante aus 500–800 mM Betain und 1–6 mM Magnesiumchlorid. In einer weiteren bevorzugten Variante besteht er aus 500–800 mM Betain, 1–6 mM Magnesiumchlorid, 6–14 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin mit pH 8,3 und 80–120 µg/ml Rinder-Serumalbumin V.

Die Auswahl des erfindungsgemäßen Puffers basiert zum einen auf dem Befund, daß bereits geringe Salzkonzentrationen im PCR-Medium die Amplifikation bestimmter HLA-B-Allele negativ beeinflussen können. Der Puffer enthält deshalb im Gegensatz zu den üblichen Puffern kein Kalium- oder Ammoniumchlorid.

Betain kombiniert zudem eine Reihe von Vorteilen herkömmlicher, bisher in der PCR und reversen Transkription (RT) verwendeten Kosolventien:

Es ist chemisch inert und nicht-ionisch, d. h. es kann mit einer Anzahl anderer Kosolvenzien und Salzen kombiniert werden, um optimale Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Primer und Template zu schaffen.

Daneben erleichtert es die Transkription GC-reicher Domänen. Da nur GC-Basenpaare destabilisiert werden, können Primer so gewählt werden, daß ihre Hybridisierung mit der Zielsequenz möglichst wenig beeinträchtigt wird.

Allgemeine Destabilisierung von dsDNA, z. B. durch Glycerin, Dimethylsulfoxid oder Formamid, setzt auch die Hybridisierungstemperatur der Primer herab und hat damit sowohl positive wie negative Auswirkungen auf die Ausbeute von DNA-Polymerase-Reaktionen. Betain ist unter den nicht-ionischen Kosolvenzien einzigartig in seiner Eigenschaft, AT-Basenpaare zu binden und dadurch zu stabilisieren. Da nicht-ionische Kosolvenzien allgemein dsDNA destabilisieren, erfolgt in Anwesenheit von Betain insgesamt eine spezifische Destabilisierung GC-reicher Domänen in DNA und RNA. Betain ist jedoch erheblich billiger als Deoxyguanidin-Analoge wie sie zu diesem Zweck in Sequenzierung und PCR erfolgreich eingesetzt wurden und kann außerdem auch in der RT verwendet werden. AT-reiche Primer wie z. B. (dT)_{12–18} in der RT werden jedoch weniger beeinflusst als GC-reiche Domänen im Templat.

Magnesiumchlorid ist ein essentieller Kofaktor für DNA-Polymerasen, jedoch hängt die optimale Konzentration in der PCR stark von den jeweiligen Primern oder Templaten ab. In Gegenwart von Betain erweitert sich dieser optimale Bereich, wodurch sich die Optimierung, insbesondere von Koamplifikationen ("Multiplex-PCR"), vereinfacht.

Desweiteren ist bekannt, daß sowohl NaCl als auch Heparin als Verunreinigungen in DNA-Proben auftreten können. So hat Heparin in Konzentrationen zwischen $2,5 \cdot 10^{-4}$ – 10^{-3} U/µl ähnliche Effekte wie NaCl. Im Stand der Technik wurde deshalb Heparinate-Verdau oder Vorbehandlung Heparinenthaltender DNA mit Chelex 100 vorgeschlagen (Francesca Poli, Rosa Catteano, Loretta Crespiatico, Angelea Nocco und Girolamo Sirchia, PCR Methods and Applications, 1993, 2, 356–358).

Es wurde nun gefunden, daß die PCR-Ausbeuten, insbesondere von HLA-B, bei Heparin-enthaltenden DNA-Proben in Gegenwart von Betain deutlich verbessert werden können. Vorzugsweise zeigen sich diese Befunde bei Betainkonzentrationen von 500–800 mM. In Gegenwart von 0,8 M Betain werden bis zu 10fach höhere Heparinkonzentrationen toleriert.

Betain macht also die Aufreinigung von Salz- oder Heparinenthaltenden DNA-Proben weitgehend überflüssig, was vor allem in der routinemäßigen Untersuchung klinischer und forensischer Proben von Vorteil ist.

Daneben ist Betain im Gegensatz zu den Kosolvenzien DMSO, Formamid und Methyl-Quecksilberhydroxid ungiftig und ein natürlicher Schutz, den Zellen im Laufe der Evolution gegen thermische und ionische Denaturierung ihrer Proteine entwickelt haben.

Die Aktivität der Taq-Polymerase und der reversen Transkriptase wird durch Betain nicht merklich beeinträchtigt.

Als temperaturstabile DNA-Polymerase wird erfindungsgemäß bevorzugt Taq-Polymerase eingesetzt.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Testkits gegenüber dem Stand der Technik liegen in den folgenden

Punkten

- a) Der Betainpuffer macht die Reaktion robuster gegenüber verschiedenen Methoden der DNA-Präparation und NaCl-Verunreinigungen, wie bereits ausgeführt.
- b) Die erfindungsgemäß eingesetzten Primer sind für maximale Spezifität und Robustheit ausgewählt, wobei folgende Punkte von Bedeutung sind 5
- Erkennung möglichst weniger HLA-Allele,
 - soweit möglich Vermeidung von 3'-Desoxy-Thymidin in Primern oder in der komplementären Position auf allen bekannten Allelen der HLA-Klasse I,
 - Kontrolle der letzten 10 Nukleotide auf häufige Sequenzmotive im menschlichen Genom (Vergleich mit einer Datenbank menschlicher Sequenzen: Genbank Release 81.0, 2/94) wie z. B. konservierte Strukturen der Immunglobulinfamilie, um die Gefahr von PCR-Artefakten zu verringern. 10
- c) Die Zahl der zur B27-Amplifikation benötigten PCR-Cyclen ist geringer als im Stand der Technik.
- d) Der erfindungsgemäße Kit kann flexibel gestaltet werden, um einige oder mehrere der mit Spondyloarthropathien assoziierten B7-kreuzreaktiven Antigene B60 (B40), B27, Bw22 und B7 sowie die möglicherweise assoziierten Allele B44 und B62 (B15) oder das mit Psoriatischer Arthritis assoziierte Allel B13 zu bestimmen. 15
- e) Die internen Kontrollen (Gene XA/XB) beinhalten einen gut dokumentierten Marker für einen HLA-KlasseIII Locus, durch den in manchen Fällen der mit dem HLA-B-Allel assoziierte MHC-Haplotyp eingeschätzt werden kann. 20
- f) Die internen Kontrollen wurden sorgfältig ausgewählt (Gene XA/XB oder TNF β) und getestet, um sicherzustellen, daß das HLA-B Produkt unter allen Bedingungen gleich gut oder besser amplifiziert wird.
- g) Die amplifizierten HLA-B Produkte variieren in ihrer Länge von ca. 400–800 Nukleotiden, so daß die Möglichkeit besteht, mehrere HLA-Bestimmungen im selben Reaktionsvolumen durchzuführen, um so Kosten und Arbeitsaufwand zu sparen. 25

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der erfindungsgemäße Testkit zu einem wesentlichen Fortschritt in der Diagnose von Spondyloarthritiden und ähnlichen Erkrankungen führt.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von HLA-Allel-spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primern, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind, und einem Betain-enthaltenden Puffer zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation und insbesondere zur Amplifikation eines Fragmentes des HLA-B-Gens enthaltend Sequenzen von Exon 2 bis Exon 3. 30

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden. 35

Ausführungsbeispiele

a) Reaktionsansatz

Die Amplifikationen werden in DNA-Thermocyclern (z. B. dem DNA-Thermocycler 480 der Firma Perkin-Elmer-Cetus) in 500 μ l "Eppendorf"-Reaktionsgefäßen durchgeführt. 40

DNA wird durch Verdauung von zu untersuchenden Proben mit Proteinase K und nachfolgende Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen. Zur Reaktion werden Mengen von 50–1000 ng in einem 20 μ l Reaktionsvolumen eingesetzt. 45

Der Ansatz enthält außerdem:

10 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin, pH 8,3 bei 20°C (Tricin)
 100 μ g/ml Rinder-Serumalbumin (BSA V)
 0,2 mM je Nukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 3 ng/ μ l je Primer
 0,025 U/ μ l Taq-Polymerase 50

mit TNF β als Kontrolle:

600 mM N,N,N-Trimethylglycin (Betain)
 3 mM Magnesiumchlorid 55

mit Genen XA/XB als Kontrolle:

800 mM N,N,N-Trimethylglycin (Betain)
 4 mM Magnesiumchlorid 60

b) Temperaturschritte

Die PCR-Programme werden in folgenden Temperaturschritten durchgeführt: 65

4' 94 °C Vordenaturierung

B27-PCR

allgemein (einschl. B27)

5	40 Cyclen a'	1' 94 °C	5 Cyclen a'	1' 94 °C
		1' 60 °C		1' 68 °C
10		1' 72 °C		1' 72 °C
			5 Cyclen a'	1' 94 °C
15				1' 64 °C
				1' 72 °C
20			30 Cyclen a'	1' 94 °C
				1' 60 °C
				1' 72 °C

9' 72 °C Primer-Verlängerung

25

Erfindungsgemäß erweisen sich in Gegenwart von Betain Hybridisierungstemperaturen, die ca. 10°C niedriger liegen als die theoretische Denaturierungstemperatur der Primer, und MgCl₂-Konzentrationen zwischen 3 und 4 mM als vorteilhaft.

30

c) Detektion

35

Erfolgreiche Amplifikation der internen Kontrolle und gegebenenfalls eines allelspezifischen HLA-B-Fragments wird durch Elektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel, 0,5× TBE-Puffer geprüft. DNA-Banden werden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und Fluoreszenz unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Die Länge der erhaltenen PCR-Produkte ist eine Kontrolle für die Spezifität der PCR für HLA-B.

d) Ergebnisse

40

HLA-B27, B7, B8, B41, B42, B60, B61 und B73 wurden unter obigen Bedingungen erfolgreich amplifiziert. Die Spezifität der HLA-B PCR wurde mit Hilfe der folgenden Standard-Zelllinien getestet: Positive Kontrollen waren

45

- a) für B27 und seine Subtypen: HOM2, JESTHOM, WT24, LS40 sowie die nicht-standartisierten Linien LH, NW, R69 und Wewak,
- b) für B60 (B*40012): SLE, MADURA, MT14B, PE117, BRU, RLO, LS40 (B27/B60)
- c) für B7: HHKB, SAVC, LD2B, R69 (B7/B27)
- d) für B8: VAVY, LH (B8/B27)
- e) für B42: RSH
- f) für B41: RLO (B38/B41)
- g) für B61 (B*4002): SWEIG.

50

55

Als Negativkontrolle dienten außerdem zahlreiche weitere, für die häufigsten HLA-B-Allele repräsentative, Standardlinien oder Linien, deren Allelsequenz zu einem der beiden verwendeten Primern vollständig komplementär war (z. B. B14 und B16 mit B7CREG1 in der B27-PCR).

60

Von 51 sowohl serologisch als auch mit Hilfe der PCR auf HLA-B27 untersuchten Spendern wurde in 43 Fällen positive Übereinstimmung zwischen beiden Tests und in 6 Fällen negative Übereinstimmung gefunden. Eine Probe eines Patienten mit Bechterew war serologisch B27-negativ und positiv anhand des PCR-Ergebnisses. Einmal wurde kein PCR-Produkt von einem serologisch positiven gesunden Spender erhalten. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde weiterhin durch Gelelektrophorese (Größe) und in den Amplifikationsprodukten von 22 verschiedenen vollständig HLA-B typisierten B27-heterozygoten Proben durch Verdau mit Restriktionsenzymen bestätigt.

Unspezifische (Co-)Amplifikationen wurden unter den obigen Bedingungen nicht beobachtet.

65

Um den Einfluß von Tetramethylammoniumchlorid, Betain und NaCl auf die Amplifikation von B7, B8 und B27 zu untersuchen wurden vier Puffer enthaltend 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl₂ getestet: zwei handelsübliche (Boehringer Mannheim, Promega) mit Tris sowie zwei eigene mit Tris oder Tricine.

Es zeigte sich, daß 50 mM KCl sowie geringe Verunreinigungen mit 5–10 mM NaCl (final) die PCR der HLA-B-Allele der internen Kontrollen erst bei 70 mM NaCl-Konzentrationen behindern. Verbesserte Amplifi-

kation wird jedoch in Gegenwart von 50 mM TMAC1 erzielt und optimale PCR von HLA-B7, B8 und B27 bei 0,6–1,0 M Betain- und 2,5–4 mM MgCl₂-Konzentrationen. Oberhalb dieser Grenzen wirkt Betain inhibierend auf eine PCR mit den oben genannten Primern. Während die Amplifikation der internen Kontrollen in Abwesenheit isostabilisierender Substanzen robuster als die HLA-B PCR ist, kehrt sich dieses Verhältnis in Gegenwart von Betain und TMAC1 um.

5

Referenzen für Angaben zur genomischen Position der Primer

Accession-Nummern beziehen sich auf Genbank Release 81.0 (2/94). Die Positionen der HLA-B Primer wurden so angegeben wie sie auf der Sequenz X03945 des Allels HLA-B*2705 liegen würden, ungeachtet von evtl. 3'-Mißpaarungen. Die Länge der PCR-Produkte für die verschiedenen Primerkombinationen wurden ebenfalls so angegeben als ob ein Fragment der Sequenz X03945 amplifiziert würde.

10

a) HLA-B primer : Accession X03945

Authors: Weiss, E. H., Kuon, W., Doerner, C., Lang, M. and Riethmüller, G.

15

Title: Organization, sequence and expression of the HLA-B27 gene:

A molecular approach to analyze HLA and disease associations

Journal: Immunobiology 170, 367–380 (1985)

b) XA/XB Primer : Accession X71937

Authors: Bristow, J., Tee, M. K., Gintelman, S. E., Mellon, S. H. and Miller, W. L.

20

Title: Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B

Journal: J. Cell Biol. 122, 265–278 (1993)

c) TNFβ-Primer: Accession M16441

Authors: Nedospasov S. A., Shakhov A. N., Turetskaya R. L., Mett V. A., Azizov M. M., Georgiev G. P., Korobko V. G., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Bystrov N. S., Boldyreva E. F., Chuvpilo S. A., Chumakov A. M., Shingarova L. N., Ovchinnikov Y. A.;

25

Title: "Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) in the human genome";

Journal: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 : 611–624 (1986).

30

d) B*40011: Accession M27540

Authors: Arnot D., Lillie J. W., Auffray C., Kappes D., Strominger J. L.;

Title: "Inter-locus and intra-allelic polymorphisms of HLA class I antigen gene mRNA"; (Figure 3. The nucleotide sequences of the three clones JY103, (LB4.2, and LB45.)

Journal: Immunogenetics 20 : 237–252 (1984).

35

e) B*40012: Accession M95530

Authors: Kawaguchi, G., Kato, N., Kashiwase, K., Karaki, S., Kohsaka, T., Akaza, T., Kano, K. and Takiguchi, M.

Title: Structural analysis of HLA-B40 epitopes

Journal: Hum. Immunol. 36, 193–198 (1993)

40

Patentansprüche

1. Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen (HLA) in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation, beinhaltend temperaturstabile DNA-Polymerase, eine DNA-Matrize, die Desoxynukleotid-5'-triphosphate dATP, dGTP, dTTP und dCTP, einen Puffer für die Polymerase-Kettenreaktion und zwei Allel-spezifische Oligodesoxynukleotid-Primer, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer Betain enthält und die eingesetzten Primer am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind.

45

2. Testkit nach Anspruch 1 zur Bestimmung von HLA-B-Allelen.

50

3. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B27 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCA CGT CGC AGC CAT ACA TA 3',

55

spezifisch für die Allele B*2701, B*2702, B*2703, B*27051, B*27052, B*2706 und entweder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GCC GCG AGT CCG AGA GA 3',

60

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, BSS, B56, B73 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC CGC GAG TCC GAG AG 3',

65

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, B48, B54, B55, B56, B73, B79 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 beinhaltet.

5 4. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der B27-Subtypen B*2701, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706 und zur Unterscheidung dieser Subtypen von B*2702, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3',

10

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B27 (mit Ausnahme des Subtyps B*2702), B37, B44, B47 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCA CGT CGC AGC CAT ACA TA 3',

15

spezifisch für die Allele B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*27051, B*27052, B*2706 beinhaltet.

5. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B44 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

20 5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B27 (mit Ausnahme des Subtyps B*2702), B37, B44, B47 beinhaltet und der 3'-Primer die Sequenz

25

5' CAC CAG GTA TCT GCG GAG CG 3',

aufweist.

6. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B45 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

30

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

35

5' CAC CAG GTA TCT GCG GAG CG 3',

beinhaltet.

40

7. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B7 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B*40011, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

45

5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B13, B27, B40, B47, B*4801, B73 beinhaltet.

50

8. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der B7-Subtypen B*0701, B*0702 und zur Unterscheidung dieser Subtypen von B*0703, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3',

55

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*0701, B*0702, B*40011, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3',

60

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B13, B27, B40, B47, B*4801, B73 beinhaltet.

9. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-Bw22 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GAA CAC ACA GAT CTA CAA GGCC 3',

65

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*0701, B*0702, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' TGT AAT CCT TTC CGT CGT AGG CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B45, B49, B50, B54, B55, B56 beinhaltet.
10. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B13 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

5

5' TGT AAT CCT TTC CGT CGT AGG CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B45, B49, B50, B54, B55, B56 und entweder einen 5'-Primer mit der Sequenz

10

5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B27 (mit Ausnahme des Subtyps B*2702), B37, B44, B47 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

15

5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1502, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1516, B*1517, B13, B46 und B57 beinhaltet.
11. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der HLA-Allele B14, B18 oder B73, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

20

5' CTC CTT CCC GTA CTC CAG GTG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B14, B18, B*5101, B*5103, B*5104, B52 und B73 sowie zur Amplifikation von B14 und B73 einen 5'-Primer mit der Sequenz

25

5' GCC GCG AGT CCG AGA GA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, B48, B54, B55, B56, B73 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

30

5' CGC CGC GAG TCC GAG AG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, B48, B54, B55, B56, B73, B79 beinhaltet sowie zur Amplifikation von B18 und B73 einen 5'-Primer mit der Sequenz

35

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 beinhaltet.

40

12. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur spezifischen Amplifikation der Allele und serologischen Spezifitäten Bw21 oder B45, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

45

5' GAG GAG GCG CCC GTC G 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B35, B45, B*4802, B49, B50, B53 und B58 sowie einen 5'-Primer mit der Sequenz

50

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 beinhaltet.

13. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung des Allels B*4001 unter Verwendung B41/B*4001-spezifischer Amplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

55

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 sowie einen 3'-Primer mit der Sequenz

60

5' CC GCG CGC TCC AGC TTG 3',

spezifisch für B7, B8, B*40011, B*40012, B41, B42 und B*4801 beinhaltet.

14. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zur Unterscheidung von B*40011 und B41 durch Reamplifikation des mit den Primern aus Anspruch 13 erhaltenen PCR-Produktes ein 3'-Primer mit der Sequenz

65

5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B13, B27, B40, B47, B*4801, B73 enthalten ist.
15. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der Allelgruppe B*1501, B*1505, B*1507 und B*1517, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1502, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1516, B*1517, B13, B46 und B57 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCC CAC GTC GCA GCC G 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1505, B*1507, B*1509, B*1510, B*1517, B7, B8, B16, B18, B*2707, B*3505, B*4001, B*4002, B*4003, B*4005, B42, B*4401, B*4402, B*4403, B*4405, B*4801, B*5602, B79 beinhaltet.

16. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung des Allels B42 unter Verwendung B7/B42-spezifischer Amplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß er entweder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GAA CAC ACA GAT CTA CAA GGC CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*0701, B*0702, B42, B54, B55, B56 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CC GCG CGC TCC AGC TTG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B*40011, B*40012, B41, B42 und B*4801, beinhaltet und die Abwesenheit von B*0701/B*0702 durch das Primerpaar nach Anspruch 8 ausgeschlossen wird.

17. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B57 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1502, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1516, B*1517, B13, B46 und B57 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCA CGT CGC ATC CAT ACA TCA C 3',

spezifisch für das Allel der serologischen Spezifität B57 beinhaltet.

18. Testkit zur Bestimmung von HLA-B-Allelen und Allelgruppen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er je einen der in den Ansprüchen 3 bis 17 genannten 5'-Primer und je einen der in den Ansprüchen 3 bis 17 genannten 3'-Primer in beliebiger Kombination enthält.

19. Testkit nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er mehrere der in den Ansprüchen 3 bis 17 genannten 3'- und 5'-Primer zur gleichzeitigen Amplifikation verschiedener Allele und Allelgruppen in derselben Reaktion enthält ("Multiplex-PCR").

20. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er als interne Kontrolle zur Amplifikation eines Fragments des Gens XB und, in den entsprechenden MHC-Haplotypen, zusätzlich des Gens XA einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' AAC TGC AGA GCG ACT TCC ATT C 3',

und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' AGG TCA TGC AGG GG TAG TCC A 3',

beinhaltet.

21. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 5, 7 bis 10, 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Amplifikation eines Fragments des Gens TNF β als interne Kontrolle einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGT GCT TCG TGC TTT GGA CTA 3',

und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' AGCTGG TGG GGA CAT GTC TG 3',

beinhaltet.

22. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß er als thermostabile DNA-Polymerase Taq-Polymerase enthält.

23. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer 200—1000 mM Betain enthält.

24. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer 500—800 mM Betain und 1—6 mM Magnesiumchlorid enthält.

25. Verwendung von HLA-Allel-spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primern, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind, und einem Betain-enthaltenden Puffer zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation.

26. Verwendung gemäß Anspruch 25 zur Amplifikation eines Fragmentes des HLA-B Gens enthaltend Sequenzen von Exon 2 bis Exon 3.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65